

BEITRÄGE ZUR PATHOPHYSIOLOGIE
DER PROTEASEINHIBITOREN

KAI TAEGER

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548328_0018

Aus dem klinisch-chemischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. E. Werle

"Beiträge zur Pathophysiologie der Proteaseninhibitoren"

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kai Taeger

aus

Fürstenfeldbruck

Jahr

1970

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. E. Kraft

Tag der mündlichen Prüfung: 23.6.1970



Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle für die Bereitstellung der erforderlichen Mittel, das Interesse an meiner Arbeit und für seine richtungsweisen Anregungen. Herrn Dr. K. Hochstraßer danke ich für die reichen Mengen an Inhibitoren, die er mir zur Verfügung stellte, sowie für seine stete, freundliche Hilfsbereitschaft. Ebenso gilt mein Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Fritz für die Überlassung tierischer Inhibitoren. Herrn Dr. K. E. Reichenbach-Klinke habe ich ganz besonders zu danken; seine tatkräftige Unterstützung hat mir die ersten Schritte sehr erleichtert. Von Herrn Prof. Dr. G. Orzechowski, Köln, habe ich den Hinweis auf die Methodik des Pfotenödemversuchs erhalten; auch ihm sei dafür herzlich gedankt.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
A) Einleitung	5
B) Theoretischer Teil	7
I) Chemie und Wirkungsweise von Proteasenin- hibitoren	7
II) Untersuchungen über die Wirkung verschie- dener Inhibitoren bei experimentell erzeug- ten Entzündungen der Rattenpfote	9
1) Einführung	9
2) Ergebnisse	14
3) Diskussion der Ergebnisse	25
III) Wirkung von pflanzlichen Proteaseninhibi- toren bei den proteolytischen Vorgängen der Blutgerinnung	30
IV) Untersuchung der renalen Ausscheidung zweier pflanzlicher Inhibitoren	33
C) Experimenteller Teil	35
I) Pfotenödemversuch, Methodik und Material	35
II) Methodik des Nativblutgerinnungstests (modifiziert nach Lee-White)	40
D) Literaturverzeichnis	41
E) Anhang: Statistisch ausgewertete Ergebnis- se des Pfotenödemversuchs in Zahlen	43

A) Einleitung

Die pathophysiologischen Mechanismen des Entzündungsgeschehens aufzuklären, bemüht sich die medizinische Wissenschaft seit ihren Anfängen. Erst zweitausend Jahre nach der Beschreibung der Kardinalsymptome der Entzündung - Rubor, Tumor, Calor, Dolor (Celsus) und Functio laesa (Galen) - rücken die Möglichkeiten der modernen Physiologie und Biochemie dieses Ziel in greifbare Nähe.

Einen wesentlichen Beitrag zur Theorie des Entzündungsgeschehens lieferte die Entdeckung und Bearbeitung des Kallikrein-Kinin-Systems. Bei der umfassenden Untersuchung dieses Systems durch den Arbeitskreis um Werle ergaben sich frühzeitig Hinweise auf seine entscheidende Beteiligung am entzündlichen Geschehen. Schon bald gelang es, Kallikreine und Kinine in entzündlichen Exsudaten nachzuweisen (1), und Entzündungen, z.B. die akute Pankreatitis, mit spezifisch gegen Kallikrein gerichteten Inhibitoren erfolgreich zu behandeln (2). Der einzige derzeit therapeutisch verwendete Proteaseninhibitor mit Antikallikreinwirkung ist der Inhibitor aus Rinderlunge.

Es zeigte sich auch, daß bei einer Entzündung gleichzeitig mit diesem System immer auch das Gerinnungs- und das Fibrinolysesystem aktiviert werden, bei denen ausschließlich proteolytische Enzyme beteiligt sind. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem "Wirkungsdreieck"

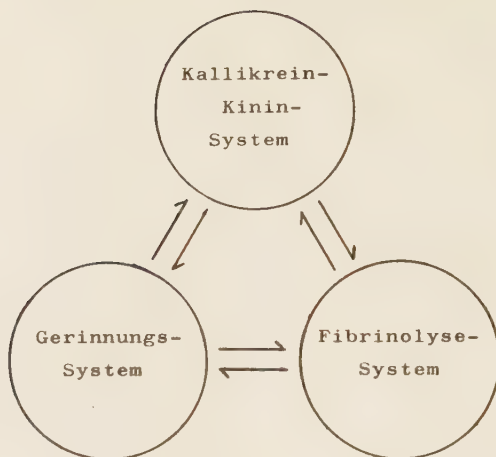


Abb. 1 : "Wirkungsdreieck"

Durch ein spezielles Isolierungsverfahren gelang es in letzter Zeit in der Arbeitsgruppe Werle, eine große Anzahl von Proteaseninhibitoren aus tierischem und pflanzlichem Material mit unterschiedlichen Hemmspektren zu gewinnen.

Die vorliegende Arbeit sollte feststellen, inwieweit diese isolierten, charakterisierten Inhibitoren, welche verschiedene Faktoren der Systeme des "Wirkungsdreiecks" ausschalten können, bei experimentell erzeugten Entzündungen der Rattenpfote eine Wirkung zeigen. Aus der Modifikation des Entzündungsablaufes durch diese Inhibitoren erhofften wir uns Hinweise auf die Art und das Ausmaß der Beteiligung der Systeme an entzündlichen Prozessen. Zusätzlich untersuchten wir den Einfluß spezi-

ell pflanzlicher Proteaseninhibitoren auf die Nativblutgerinnung. Bei zwei pflanzlichen Inhibitoren bestimmten wir noch die renale Ausscheidungsquote.

B) Theoretischer Teil

1) Chemie und Wirkungsweise von Proteaseninhibitoren

Durch das von Fritz und Werle (3) eingeführte Verfahren zur Isolierung von Proteaseninhibitoren gelang es erstmals, eine größere Zahl tierischer und pflanzlicher Inhibitoren in reiner Form darzustellen und deren pharmakologische Wirkung zu prüfen.

Das Verfahren beruht darauf, daß es möglich ist, Proteasen kovalent an polymere Träger zu binden, wobei ein wasserunlösliches Enzymharz entsteht. Die gebundenen Enzyme vermögen ihrerseits ihre spezifischen Inhibitoren spezifisch zu binden. Es gelingt, aus Rohhomogenaten durch einfaches Rühren mit Enzymharzen die Inhibitoren selektiv an das Harz zu binden. Die Verunreinigungen können ausgewaschen werden, die gebundenen Inhibitoren werden durch Erniedrigung der H^+ -Jonenkonzentration oder durch Behandlung mit Harnstofflösung desorbiert. Durch wenige nachgeschaltete Reinigungsschritte erhält man reine Inhibitoren (4).

Bei der näheren Untersuchung der so erhaltenen Inhibitoren wurde gefunden, daß die meisten Hemmstoffe während der Komplexbildung mit Trypsinharz chemisch modifiziert werden. Die Inhibitoren enthalten durchwegs zwei N-terminale Aminosäuren; sie bestehen aus zwei Peptidketten. Es zeigte sich, daß offensichtlich bei der Modifizierungsreaktion eine definierte Peptidbindung gespalten wird. Diese Peptidbindung stellt das aktive Zentrum des betreffenden Inhibitors dar. Es wurde nachgewiesen, daß die an dieser Bindung beteiligten basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin für die Wirkung als Inhibitor notwendig sind. Enzymatische Abspaltung der Aminosäurereste (5) oder chemische Blockierung durch Acylierung der epsilon-Aminogruppe des Lysins (6) oder Umsetzung der Guanido-Gruppe des Arginins durch Butadion inaktiviert die Inhibitoren.

Die Hemmwirkung der natürlichen Proteaseninhibitoren kommt also dadurch zustande, daß die Inhibitoren für die entsprechenden Proteasen Substrate darstellen; das heißt, sie bilden Enzym-Substratkomplexe und reagieren untereinander, der Zerfall in Proteolyseprodukte und freies Enzym unterbleibt jedoch.

II) Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Inhibitoren bei experimentell erzeugten Entzündungen der Rattenpfote

1) Einführung

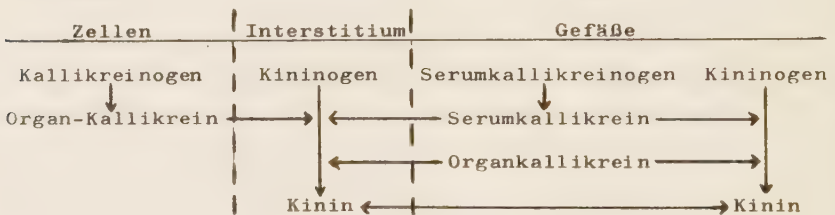
Am Ort der Entzündung tritt eine Gefäßweiterung auf, eine Erhöhung der Permeabilität der Kapillaren und/oder Venolen (Waldvogel, Frimmer (7)), Leukocytenmigration, Schmerz und eine Störung energieliefernder Prozesse. Diese Erscheinungen entsprechen den pharmakologischen Wirkungen der Kinine (Lewis (8) und Berndt, Frimmer und Rhode (9)). Deshalb wird seit langem angenommen, daß das Kallikrein-Kinin-System an entzündlichen Prozessen maßgeblich beteiligt ist.

Lewis (8) und andere Untersucher haben nachgewiesen, daß es im traumatisch geschädigten Gewebe zur Aktivierung von Präkallikreinen mit nachfolgender Liberierung von Kininen kommt. Gleichzeitig werden die Kallikreine des Plasmas aktiviert, die ihrerseits Kinine freisetzen. Diese Zusammenhänge gibt das von Habermann (10) aufgestellte Schema (Schema 1 auf Seite 10) wieder.

Die Aktivierung der Kallikreine erfolgt durch limitierte Proteolyse, und die Kallikreine selbst sind hochspezifische Proteasen, die ihrerseits durch begrenzte Proteolyse die Kininliberierung katalysieren. "Menkin (11)

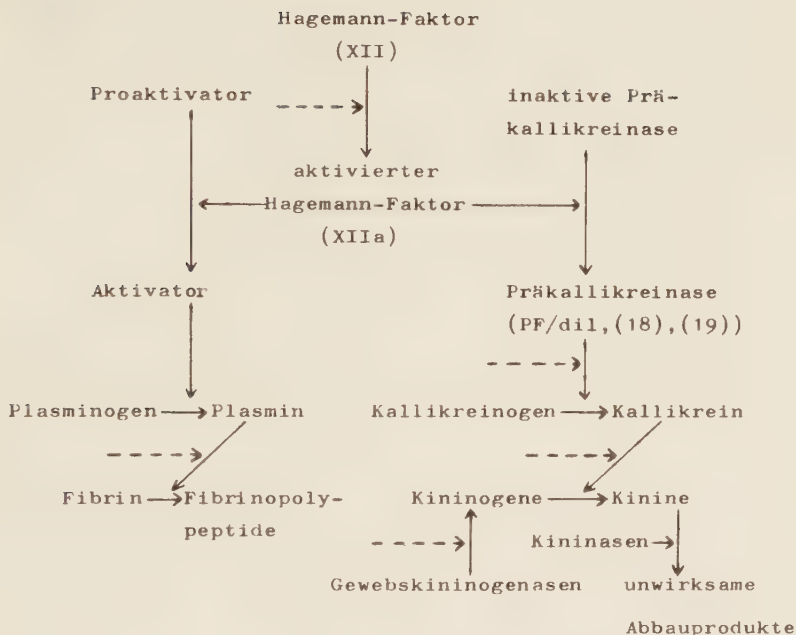
fasste die Proteolyse sogar als Kardinalsymptom der Entzündung auf, und nach Hladovek und Rybak (12), Kalbhen (13) sowie Mörsdorf und Cornelissen (14) zeigt sich eine weitgehende Parallelität zwischen der Stärke der entzündlichen Reaktion und dem Ausmaß der Proteolyse und Esterolyse." (zitiert nach Förster, Kaiser und Stoklaska, (15)).

Schema 1:



Wird das Entzündungsgeschehen in dieser Weise gesehen, so liegt nahe, von der Verwendung von Proteaseninhibitoren eine Wirkung auf das Entzündungsgeschehen zu erwarten. Dementsprechend fand Kaller (16), daß das Formalinödem der Rattenpfote durch den polyvalenten Inhibitor aus Rinderorganen, Trasylol^R, hemmbar ist. Mansfeld, Rybak, Horakova und Hladovek (17) stellten auch an pflanzlichen Inhibitoren eine entzündungshemmende Wirkung fest. Im folgenden Schema 2 (Seite 11) sind die bei Entzündungsvorgängen beteiligten proteolytischen Enzyme zusammengestellt und die Angriffspunkte für Proteaseninhibitoren eingezeichnet.

Schema 2:



- - - ->: Angriffspunkte der Proteaseninhibitoren.

(in Anlehnung an Schemata von Webster (20) und Eisen (21))

Die Koppelung des Blutgerinnungssystems und des Fibrinolyse systems mit dem Kininsystem über den Hagemann-faktor, wie sie in diesem Schema zum Ausdruck kommt, und ihr Ineinandergreifen bei Entzündungsprozessen haben Webster und Innerfield (19) folgendermaßen dargestellt:

"Der Entzündungsreiz aktiviert das Kallikrein-Kallidin-

System, möglicherweise durch Kontakt mit negativ geladenen Partikeln oder durch andere Mechanismen. Die Freisetzung von Kallidin zusammen mit der entzündlichen Schädigung erzeugt eine ausgeprägte Diskontinuität des Endothels, die es den Plasmaproteinen ermöglicht, in das geschädigte Gebiet zu gelangen. Der Kontakt von Plasmaproteinen mit dem extrazellulären Raum aktiviert den Gerinnungsmechanismus, wodurch Fibrin in den Poren oder Kanälen der Basalmembran abgelagert wird. Auf diese Weise wird das geschädigte Gebiet abgeriegelt. In Gegenwart von Plasmin sind die Poren nicht auf die Dauer verschlossen. So wird die Bildung eines Ödems verhindert. Das Präplasmin-Plasmin-System und das Präkallikrein-Kallikrein-System wirken in einem enzymatisch kontrollierten System als biologische Antagonisten, deren Aufgabe es ist, die Gewebshomöostase im entzündeten Gebiet einzuleiten und wiederherzustellen" (zitiert nach Frey, Kraut, Werle (22)).

Neben tierischen und pflanzlichen Proteaseninhibitoren, deren Hemmspektrum aus Tabelle 1 (Seite 13) hervorgeht, haben wir auch Antihistaminika, eine Kombination aus dem Inhibitor aus Rinderorganen und einem Antihistaminikum, weiterhin eine spezifisch gegen Plasmakallikrein gerichtete Substanz und schließlich noch zwei Kininasehemmer untersucht.

Tabelle 1:

Hemmspektrum verschiedener pflanzlicher und tierischer
Proteaseninhibitoren:

Inhibitor aus: Trypsin Chymotr. Plasmin Serum- Hagemannf.
 kallikr.

Rinderorganen (Trasylol ^R)	+	+	+	+	-
Blutegeln (Bdeilin)	+	+	+	-	-
Hundesubmandibu- laris (HSMI)	+	+	-	-	-
weißen Bohnen WB	+	-	-	-	-
Feuerbohnen FB	+	-	-	-	-
Erdnüssen PNTI IIa	+	+	+	+	+
Kartoffeln 1a	+	+	+	+	+
Kartoffeln 3	+	+	+	+	+

(Auszug aus einer Tabelle in der Habilitationsarbeit von
Hochstraßer (23)).

Ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Wirksam-
keit dieser Inhibitoren anhand einer experimentellen Ent-
zündung schien uns das durch Formaldehyd ausgelöste Ödem
der Rattenhinterpfote zu sein. Formanek, Höller und Sto-
klaska (24) fanden bei Untersuchungen über das Verhalten
der Eiweißkörper in Serum und Ödemflüssigkeit bei Ratten
mit Pfotenödemen, daß das Formalinödem als einzige der

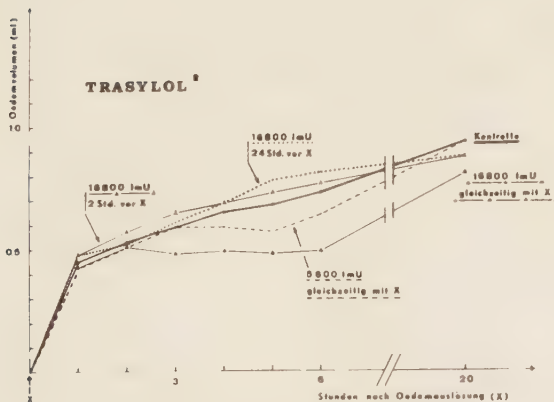
üblichen experimentellen Ödemformen dem Reaktionstyp einer subakuten Entzündung annähernd entspricht. Die Untersuchungen von Waldvogel und Frimner (7) ergaben, daß Formaldehyd ausschließlich die Membranpermeabilität der Venolen beeinflußt. Damit greift Formaldehyd am gleichen Ort an wie Histamin, Serotonin, Kinine und andere Stoffe, die auf die Hämodynamik der Mikrozirkulation einwirken.

Eine Einschränkung der Brauchbarkeit dieser Ödemform ergibt sich daraus, daß der genaue Entstehungsmechanismus des Formalinödems vorerst nicht bekannt ist. Außerdem fanden Förster, Kaiser und Stoklaska (15), daß die Aktivitäten verschiedener proteolytischer und esterolytischer Enzyme in der Ödemflüssigkeit beim Formalinödem am niedrigsten waren, sodaß von Proteaseninhibitoren bei dieser Ödemform nur relativ geringe Wirkungen zu erwarten waren.

2) Ergebnisse

Erste Erfolge in der Behandlung von Entzündungen unter dem Gesichtspunkt der Beteiligung proteolytischer Enzyme wurden mit dem polyvalenten Proteaseninhibitor aus Rinderorganen erzielt. Für diesen Hemmstoff ist belegt, daß er nicht nur alle an dem dargelegten Reaktionsschema Nr.2 beteiligten Proteasen außer dem Hagemann-Faktor (Marx (25)) hemmt, sondern besonders wirksam gegen Trypsin, Chy-

motrypsin, Plasmin, Pronase und Papain ist (26). Kaller einerseits (16), Förster und Stoklaska (27) andererseits haben die Wirksamkeit von Trasylol am Formalinödem untersucht und kamen dabei zu differierenden Ergebnissen. Während Kaller eine Hemmung der Ödementwicklung durch Trasylol nachweisen konnte, fanden Förster und Stoklaska keine signifikante Hemmung. Wir haben deshalb diese Untersuchung noch einmal durchgeführt und kamen zu folgendem Ergebnis:

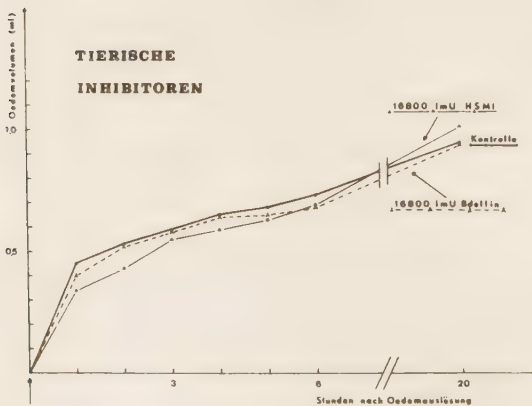


Eine ausgeprägte Ödemhemmung, deren Maximum sich erst nach drei Stunden entwickelte, fand sich bei 16 800 ImU Trasylol/kg Körpergewicht, unmittelbar vor Aus-

lösung des Ödems injiziert. Die Abweichung von der Kontrollkurve, welche aus Untersuchungen an 26 Tieren gewonnen wurde, ist im Bereich von vier bis sechs Stunden signifikant trotz der geringen Zahl an untersuchten Tieren und hoher individueller Streuungen. (Die Signifikanz wurde mit dem Student-t-Test berechnet; die Rechenwerte

für alle Kurven finden sich im Anhang.) Bei einer - willkürlich festgelegten - Signifikanzgrenze von $p \leq 0,1$ für alle Versuche ergab sich weder bei 5600 ImU noch bei 16 800 ImU, zwei und vierundzwanzig Stunden vor Ödemauslösung i.v. injiziert, eine signifikante Abweichung von der Kontrollkurve.

Aus dem von der Arbeitsgruppe Werle und Fritz bearbeiteten Gebiet der tierischen Inhibitoren untersuchten wir weiterhin den aus Blutegeln gewonnenen Proteaseninhibitor Bdellin und den aus der glandula submandibularis von Hunden extrahierten Inhibitor (Hundesubmandibularisinhibitor, HSMI). Das Hemmspektrum dieser beiden Inhibitoren ist aus der Tabelle 1 (Seite 13) ersichtlich.



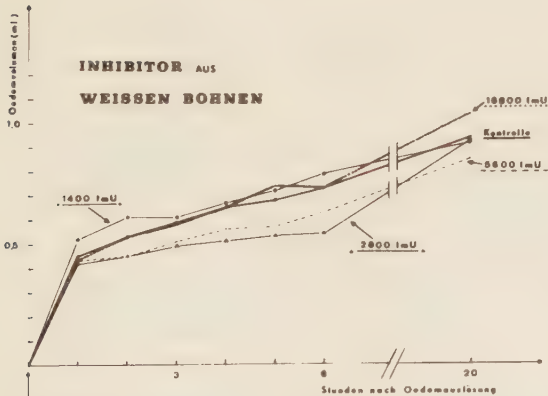
wie die Signifikanzberechnung ergibt, hemmt nur der Hundesubmandibularisinhibitor das entzündliche Ödem in den ersten zwei Stunden. Bdellin hat auf die Ödementwick-

lung keinen Einfluß.

Die von uns untersuchten pflanzlichen Proteasenin-

hibitoren wurden zum ersten Mal von der Arbeitsgruppe Werle, Hochstraßer in chemisch reiner Form hergestellt. Nebenwirkungen durch Verunreinigungen der Inhibitoren waren deshalb nicht zu befürchten.

Zuerst befassten wir uns mit zwei monovalenten Trypsinhibitoren, gewonnen aus weißen Bohnen und Feuerbohnen, bei denen wir eigentlich keine Wirkung auf die Ödementwicklung erwarteten.

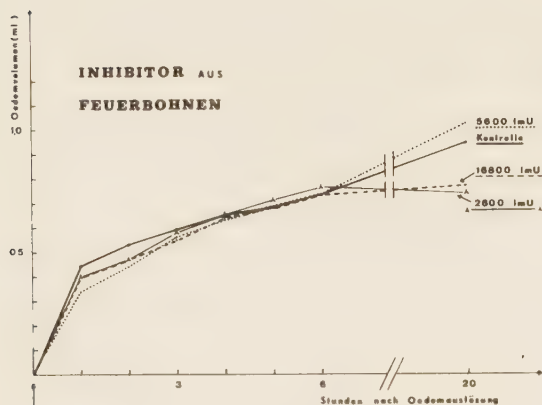


Dennoch wurde das Ödem gehemmt: Im Gegensatz zum Trasylol, wo die höhere Dosis mehr Wirkung zeigt, hemmen 2800 ImU Inhibitor aus weißen Bohnen/kg Körpergewicht,

i.v. wie alle Inhibitoren verabreicht, das entzündliche Ödem am stärksten und signifikant nach sechs Stunden, während 5600 ImU, 16 800 ImU und 1400 ImU keine signifikante Abweichung von der Kontrollkurve ergaben.

Der in einer späteren Aufarbeitung mit höherem Reinheitsgrad gewonnene monovalente Trypsininhibitor aus Feuerbohnen, in den Konzentrationsstufen 2800 ImU, 5600 ImU

und 16 800 ImU untersucht, ergibt in der ersten Stunde

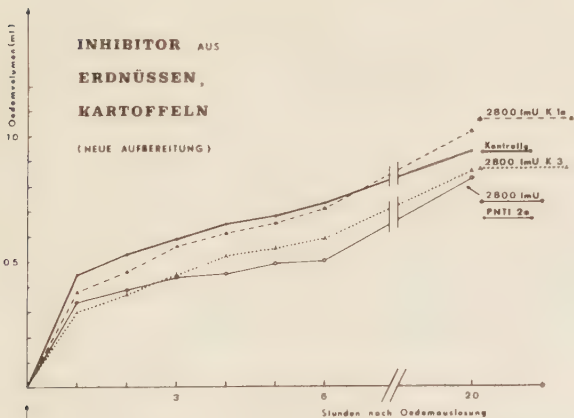


nur bei 5600 ImU eine signifikante Hemmung der Ödem-entwicklung, während auffälligerweise sowohl 2800 ImU als auch 16 800 ImU nach zwanzig Stunden die Weiterentwicklung

des Ödems deutlich verzögern. Wie in der Zwischenzeit festgestellt wurde, sind die aus den Phaseolusarten isolierten Trypsininhibitoren mit bestimmten Komponenten der Phythämagglutinine identisch. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, die Wirkungsweise dieser Hemmstoffe eindeutig zu definieren.

Die polyvalenten Inhibitoren aus Kartoffeln (28) und Erdnüssen (29) hemmen neben Trypsin und Chymotrypsin auch Proteasen des Gerinnungs- und des fibrinolytischen Systems, nämlich Plasmin und den Hagemann-Faktor. Die Hemmung der Aktivierung des Hagemann-Faktors oder des aktiven Faktors würde bereits eine Unterbrechung der Pathogenese bezüglich der Proteolyse bedeuten, da die Kallikreinogenbildung mit den Folgereaktionen dann blockiert ist. Darüber

hinaus vermögen diese Hemmstoffe jedoch durch Inhibierung bereits aktiver Kallikreine zu wirken. Da sich die Inhibitoren aus Erdnüssen von denen aus Kartoffeln in ihrem Hemmspektrum nicht unterscheiden, war von den drei untersuchten Inhibitoren eine einigermaßen entsprechende Ödemhemmung zu erwarten. Wie sich ergab, hemmen der am stärksten wirksame Erdnußinhibitor PNTI IIa und der Kartoffelinhibitor K3 das Ödem signifikant für mindestens sechs Stunden, während nach zwanzig Stunden die Abweichung vom



Kontrollwert nicht mehr signifikant ist. Die mit dem Kartoffelinhibitor K 1a behandelte Gruppe unterscheidet sich dagegen in keinem Punkt

der Kurve wesentlich von der Kontrollgruppe.

Als nächstes interessierte uns die Wirkung dreier Antihistaminika auf das Rattenpfotenödem, deren Wirkungsspektrum von Lorenz (32) genauer untersucht worden war. Wir verabreichten der einen Versuchsgruppe 200 mcg Antistin^R/kg Körpergewicht, einer weiteren 310 mcg Tavegil^R

und einer dritten 340 mcg Kolton^R, jeweils unmittelbar vor Ödemauslösung i.v. Es ergab sich:



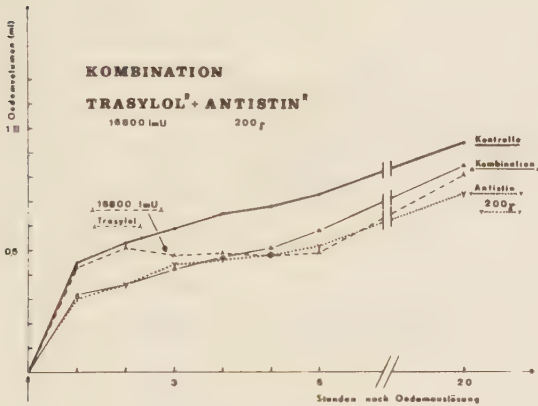
Die Ödemhemmung durch Tavegil ist im gesamten Verlauf nicht signifikant. Kolton hemmt vor allem in der ersten, weniger in der zweiten Stunde und unterscheidet

sich im weiteren Verlauf nicht mehr von der Kontrollgruppe. Die Hemmung durch Antistin ist von Anfang an und einschließlich dem 20-Stunden-Wert hoch signifikant.

Kombiniert man nun den Kallikreininhibitor Trasylol in wirksamer Dosis mit dem Antihistaminikum Antistin, so wäre zu erwarten, daß zumindest der zusätzliche Hemmeffekt des Antistins gegenüber dem Histamin die Ödemhemmung deutlich verstärkt, falls Histamin in stärkerem Maß am Zustandekommen des Formalinödems beteiligt ist. Wir führten diesen Versuch mit 16 800 ImU Trasylol und 200 mcg Antistin/kg Körpergewicht durch, indem wir den Versuchstieren Trasylol und Antistin nacheinander injizierten, wie bei den Einzelversuchen unmittelbar vor Ödemauslösung. Inter-

essanterweise folgt der Kurvenverlauf der Kombination zu-
erst dem des Antistins; beim 20-Stunden-Wert dagegen ist

eine Ödemhem-
mung nicht mehr
sicher. Das
überraschende
ist dabei, daß
die Hemmung
nicht wenigstens
den Grad der
Ödemhemmung des
Antistins und
des Trasylols

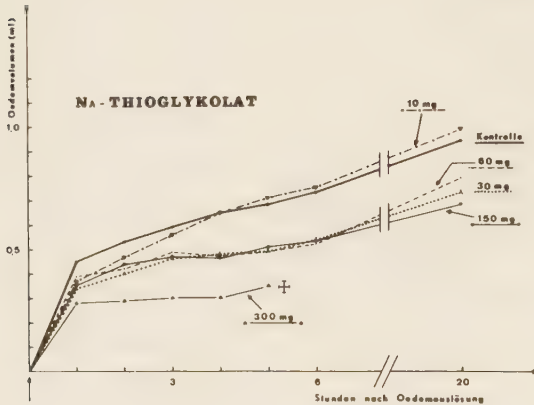


erreicht, vor allem in der sechsten und der zwanzigsten
Stunde. In keinem Punkt der Kurve erweist sich die Kom-
bination als stärker als eine der beiden Einzelkomponenten.

Eine Bestätigung für die Beteiligung des Kallikrein-
Kinin-Systems an der Entzündung sehen wir darin, daß es
möglich ist, durch den spezifischen Kallikreinzerstörer
Na-Thioglykolat in nicht toxischen Dosen eine entzündungs-
hemmende Wirkung zu erzielen. Wir untersuchten diese Sub-
stanz in Dosen von zehn, dreißig, sechzig, einhundertfünf-
zig und dreihundert Milligramm/kg Körpergewicht, i.v. vor
Ödemauslösung verabreicht. Während zehn Milligramm die
Ödementwicklung nicht wesentlich beeinflussen, sind drei-
hundert Milligramm bereits so toxisch, daß die Tiere das

Ende des Versuches nicht mehr erleben. Die festgestellte

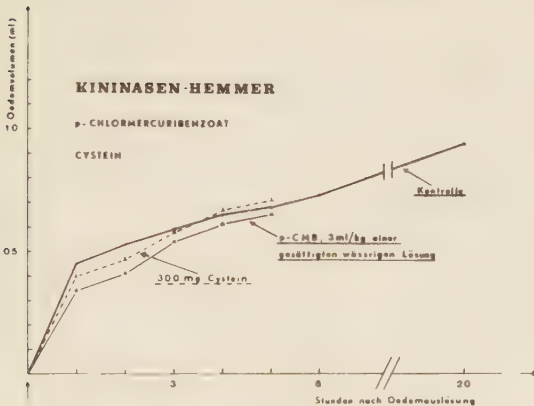
starke Ödem-
hemmung dürfte
in diesem Fall
zu einem erheb-
lichen Teil auf
den toxischen
Auswirkungen
auf den Organis-
mus beruhen.
Bei dreißig,
sechzig und ein-



hundertfünfzig Milligramm ist der Kurvenverlauf nahezu
identisch bei recht gut übereinstimmender Signifikanz
der Abweichung vom Ödemverlauf der Kontrollgruppe.

Durch Kininasehemmer wird der Abbau der Kinine zu
unwirksamen Verbindungen verzögert. Wir verabreichten
zwei derartige Substanzen in der Erwartung, daß das ent-
zündliche Ödem durch die Anhäufung von Kininen im Entzün-
dungsgebiet verstärkt wird. Wie sich zeigt, hat die i.v.-
Applikation von dreihundert Milligramm Cystein/kg Körper-
gewicht keinerlei signifikante Wirkung. Drei Milliliter/kg
Körpergewicht einer gesättigten wässrigen Lösung von para-
Chlormercuribenzoat, einem SH-Gruppen-Blocker, i.v. ver-
abreicht, hemmen entgegen unseren Erwartungen das Ödem
in den ersten zwei Stunden signifikant. Bei der Beurtei-

lung dieser Befunde ist zu berücksichtigen, daß zwei Arten



von Kininasen
in verschiedenen
Geweben nachge-
wiesen wurden,
und zwar gegen
SH-Reagenzien
empfindliche
Kininasen und
gegen SH-Reagen-
zien stabile
Enzyme.

Die folgende Tabelle (Seite 24) faßt die am Ratten-
pfotenödem gewonnenen Ergebnisse noch einmal zusammen.

Zum Aussagewert dieser Ergebnisse ist folgendes zu
sagen: Die Versuchsgruppen enthielten meistens sechs Tiere;
nur die Kontrollgruppe bestand aus sechsundzwanzig Tieren.
Für eine statistisch begründbare Aussage ist diese Zahl
natürlich sehr gering. Dazu kommt noch, daß die indivi-
duelle Reaktion der Versuchstiere auf den Formalinreiz
trotz konstant gehaltener Versuchsbedingungen sehr unter-
schiedlich ist, was sich in den oft recht hohen Werten
der Standardabweichung niederschlägt. (siehe Anhang!)

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor sind die meteorologi-
schen Einflüsse auf die Entwicklung des Pfotenödems (30),

abelle 2: Signifikanzgrenze: $p \leq 0,1$

n h i b i t o r	Dosis/kg Körperge- wicht	Zahl der Tiere	Ödemhemmung signifikant		Zeitpkt.der signif.Hemm. (in der ...Std.
			ja	nein	
<u>Proteaseninhibitoren</u> aus:					
Leberorganen: Trasylol ^R	5600 ImU	8		X	
"	16800 ImU	6	X		4.,5.,6.
"	16800 ImU 2Std.vor Öd.	6		X	
"	16800 ImU 24Std.v.Öd.	6		X	
Blutgefäße: Bdelin	16800 ImU	6		X	
Unterzungdrüse: HSMI	16800 ImU	6	X		1.,2.
Weiße Bohnen WB	1400 ImU	6		X	
" "	2800 ImU	5	X		6.
" "	5600 ImU	10		X	
" "	16800 ImU	9		X	
Feuerbohnen FB	2800 ImU	6	X		20.
"	5600 ImU	6	X		1.
"	16800 ImU	6	X		20.
Erdnüssen PNTI IIa	2800 ImU	6	X		gesamter Verlauf
Kartoffeln K 1a	2800 ImU	6		X	
Kartoffeln K 3	2800 ImU	6	X		1.,2.,3.,6.
<u>Antihistaminika:</u>					
Antazolin = Antistin ^R	200 mcg	7	X!		gesamter Verlauf
Tavegil ^R	310 mcg	6		X	
Piprinhydrinat = Kolton ^R	340 mcg	7	X		1.,2.
<u>Kombination</u> Trasylol + Antistin	16800 ImU + 200 mcg	11	X!		1. bis 6.
Na-Thioglykolat	10 mg	6		X	
"	30 mg	6	X		gesamter Verlauf
"	60 mg	6	X		2.,4.,5.,6.
"	150 mg	6	X		1.,2.,4.,5.,6.
"	300 mg	6	X!!		gesamter Verlauf
<u>Kininasenhemmer:</u> Cystein	300 mg	6		X	
para-Chlormercuribenzoat	3ml gesätt. wässr.Lösg.	6	X		1.,2.

die wir bei der großen Zahl von Untersuchungen nur inso-
weit berücksichtigen konnten, als die Werte der Kontroll-
gruppe an mehreren Tagen mit unterschiedlicher Witterung
gewonnen wurden. Andererseits war der Kurvenverlauf bei
den einzelnen Tieren recht gleichmäßig, was für die Brauch-
barkeit der Meßmethode spricht.

Unter diesen Gesichtspunkten scheint uns eine Sig-
nifikanzgrenze von $p \leq 0,1$ angemessen (Signifikanzbe-
rechnung siehe Anhang). Viel mehr als eine qualitative
Aussage - ob ein Inhibitor das entzündliche Ödem hemmt
oder nicht - dürfte nicht möglich sein; für quantitative
Angaben sind die Unsicherheiten zu groß.

3) Diskussion der Ergebnisse

Unsere mit Trasylol am Rattenpfotenödem gewonnenen
Ergebnisse decken sich nur teilweise mit den Befunden
von Kaller (16). Zwar konnten auch wir im Gegensatz zu
Förster und Stoklaska (27) eine sichere Ödemhemmung mit
16 800 ImU nachweisen, wenn diese Dosis unmittelbar vor
Ödemauslösung injiziert wurde, doch setzte die Wirkung
erst nach drei Stunden ein. Betrachtet man die Standard-
abweichung für die Meßwerte der ersten zwei Stunden, so
liegen sie mit $s = \pm 0,130$ ml bei einem Mittelwert von
0,433 ml in der ersten Stunde und $s = \pm 0,087$ ml bei ei-
nem Mittelwert von 0,513 ml in der zweiten Stunde im Ver-

hältnis zu den anderen Meßreihen noch relativ niedrig. Jedoch sprechen neben den Befunden von Kaller auch eigene Versuchsergebnisse gegen einen verzögerten Wirkungseintritt: So hemmt der spezifische Zerstörer des Plasmakallikreins, Na-Thioglykolat, von Anfang an das Ödem signifikant. Und in der Wirkung dürfte es kaum einen entscheidenden Unterschied machen, ob Kallikrein über einen gewissen Zeitraum gehemmt oder ob es gleich zerstört wird. Daß dreißig Milligramm keine geringere Wirkung als einhundertfünfzig Milligramm haben, spricht dafür, daß mit der kleineren Dosis bereits das Kallikrein-Kinin-System völlig blockiert ist. Außerdem stellten Meckel und Kemkes (31) fest, daß Trasylol sehr schnell nach der Injektion aus der Blutbahn verschwindet. Auch wenn man annimmt, daß das Trasylol im entzündeten Gewebe verankert wird, leuchtet eine Verzögerung des Wirkungseintritts nicht ein. Und schließlich führte die Injektion von Kartoffel 3 und Erdnuß IIa sofort zu einer Verzögerung der Ödementwicklung. Unverständlich ist uns allerdings, daß Kartoffel 1a die Entstehung des Pfotenödems nicht bremsen konnte.

Andererseits stützen die Ergebnisse von Kemkes und Meckel unseren Befund, daß bei einer Trasylolinjektion zwei Stunden vor Ödemauslösung eine Hemmwirkung nicht mehr nachweisbar ist, während Kaller bis zu diesem Zeitpunkt noch einen Einfluß auf die Ödementwicklung sah. Bei 5600 ImU erreicht die Ödemhemmung keine signifikanten

Werte; diese Dosis liegt aber auch bei Kaller an der unteren Grenze.

Wir erwarteten nicht, daß die spezifischeren pflanzlichen und tierischen Inhibitoren überhaupt eine Wirkung auf das Pfotenödem besitzen. Denn die an der Entzündung beteiligten Proteasen - soweit sie bekannt sind - wirken zwar trypsinähnlich, ihre Substratspezifität ist jedoch so stark ausgeprägt, daß spezifische Trypsininhibitoren ihre Aktivität nicht beeinträchtigen können. Überraschend ist auch der zeitlich so unterschiedliche Eingriff in die Ödementwicklung bei ein und demselben Inhibitor (Feuerbohnen), wenn man unterschiedliche Mengen anwendet. Die Erklärung dafür steht noch aus.

Man könnte als Zufallsbefund werten, daß 2800 ImU weiße Bohnen-Inhibitor im Gegensatz zu niedrigeren und höheren Dosen in der sechsten Stunde signifikant hemmen, jedoch fanden wir bei der Untersuchung der Wirkung pflanzlicher Proteaseninhibitoren auf die Blutgerinnung ein entsprechendes Phänomen. Möglicherweise liefert der neue Befund von Hochstraßer (23) die Erklärung. Er stellte nämlich fest, daß die pflanzlichen Inhibitoren polymer vorliegen und erst bei Enzymreaktionen eine Aufspaltung zu aktiven Untereinheiten erfolgt. Man könnte sich vorstellen, daß bei höheren Konzentrationen der Inhibitor zu höhermolekularen Komplexen zusammentritt, die sich unter physiologischen Bedingungen nur noch teilweise zu aktiven

Untereinheiten aufspalten.

Durch die Arbeiten von Lorenz (32) sind wir über die spezifischen Aktivitäten einer Reihe von Antihistaminika gut unterrichtet. Den Erörterungen über die Ergebnisse bei den Antihistaminika sei deshalb Tabelle 3 vorangestellt (Auszug aus einer Tabelle in der Habilitationsarbeit von Lorenz (32)).

	Hemmung der Kontraktion des Meerschweinchenileums ID ₅₀ (mcg/10 ml)			
	Histamin 0,5mcg/10ml	Acetylcholin 0,5mcg/10ml	Serotonin 10mcg/10ml	Bradykinin 0,5mcg/10ml
Tavegil ^R	0,010	50,0	-	16
Piprinhydrinat (Kolton)	0,005	0,13	2,6	2,0
Antazolin (Antistin)	0,220	180,0	-	230,0

Tabelle 3: Hemmung der Kontraktion des isolierten Meerschweinchenileums, ausgelöst durch Histamin, Acetylcholin, Serotonin und Bradykinin. (ID₅₀ = die Dosis, welche die Kontraktion des Meerschweinchenileums zu 50 % hemmt.)

Nach den Untersuchungen von Edery und Lewis (33) hemmen Antihistaminika die Freisetzung kininbildender Enzyme, folglich müssten sie auch auf diesem Weg entzündungshemmend wirken. Das ist bei Tavegil nicht der Fall. Nach Tabelle 3 kommt aber auch Histamin keine große Bedeutung beim Formalinödem zu, nachdem dieses spezifische

Antihistaminikum die Ödementwicklung nicht beeinflussen kann. Die geringe initiale Hemmung durch Kolton könnte durch seine starke Hemmung der Acetylcholinwirkung zustande kommen - im Einklang mit der Vermutung von Waldvogel und Frimmer (7), die eine Beteiligung von Acetylcholin bei Entzündungen für möglich hielten -, aber auch dadurch, daß es die Wirkung des Serotonins oder des Bradykinins aufhebt. Doch steht diesen Überlegungen entgegen, daß die nach Tabelle 3 in jeder Hinsicht schwächste Substanz beim Pfotenödem eine erhebliche Wirkung zeigte. Worauf allerdings diese Hemmwirkung des Antistins beruht, ist aus den vorliegenden Werten nicht abzuleiten. Solange wir keine begründeten Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus des Antistins beim Formalinödem haben, ist es auch müßig, sich über den Kurvenverlauf bei der Kombination Trasylol mit Antistin Gedanken zu machen. Und schließlich darf man nicht übersehen, daß die durch Messungen am Meerschweinchenileum gewonnenen Werte der Tabelle 3 für die experimentelle Pfotenentzündung nicht verbindlich sind, sondern nur einen Anhalt bieten.

Der SH-Gruppen-Blocker Cystein war in unseren Versuchen völlig wirkungslos. para-Chlormercuribenzoat hemmte das Ödem wider Erwarten. Eine Deutung dieses Befundes hat natürlich zu berücksichtigen, daß sehr viele Enzyme durch diese SH-Gruppen-Blocker gehemmt werden. Der gemessene Wert dürfte daher das Resultat der Überlagerung verschied-

denster Hemmeffekte sein, sodaß eine eindeutige Aussage nicht möglich ist. Ebenso wenig, wie die Ausschaltung der Kininasen durch SH-Gruppen-Blocker zur Ödemverstärkung führt, wird die Ödementwicklung durch Inaktivierung der Kininogenasen (Beispiel: Tavegil) gehemmt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die vorliegenden Resultate keine sicheren Schlußfolgerungen zulassen. Doch fällt immerhin auf, daß fast alle die Substanzen, die in das Kallikrein-Kinin-System an entscheidenden Punkten eingreifen, das Ödem über einen größeren Zeitraum hemmen können. Darin sehen wir einen weiteren deutlichen Hinweis auf die Beteiligung dieses Systems an entzündlichen Prozessen.

III) Wirkung von pflanzlichen Proteaseninhibitoren bei den proteolytischen Vorgängen der Blutgerinnung.

Das Gerinnen des Blutes ist der Endpunkt einer komplizierten Reihe von successiv ablaufenden Aktivierungsvorgängen. Wir wissen heute, daß sämtliche aktiven Gerinnungsfaktoren, die letztlich die Ausfällung von Fibrin bewirken, proteolytische Enzyme darstellen. Man weiß, daß inaktive Faktoren nur durch zugehörige aktive Faktoren im Sinne einer zeitlich und räumlich limitierten Proteolyse aktiviert werden. Das Ordnen der bisher be-

kannten Faktoren in der Reihenfolge des Reaktionsablaufs ergab die sogenannte Gerinnungskaskade.

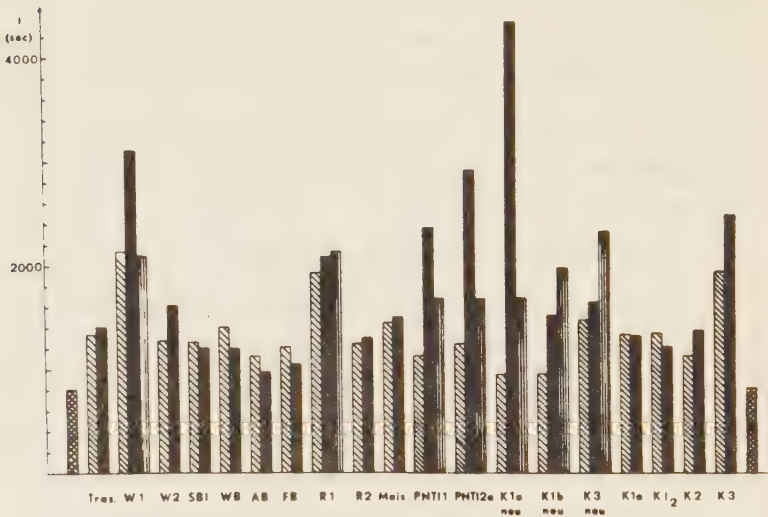
Der Ablauf der Kaskade kann einmal durch Aktivierung des endogenen Hagemannfaktors (XII) ausgelöst werden, die durch Oberflächenkontakt - wahrscheinlich über den Zerfall eines Enzyminhibitor Komplexes - erfolgt, oder durch Gewebsthrombokinasen, die in der Kaskade nachgeschaltete Faktoren (II) aktivieren.

Diese gut fundierten Vorstellungen über die Auslösung der Blutgerinnung durch proteolytische Vorgänge legten es nahe, die Wirkung natürlicher Proteaseninhibitoren auf die Blutgerinnung zu untersuchen. Gezielte Untersuchungen wurden zuerst mit dem polyvalenten Inhibitor aus Rinderorganen durchgeführt (Marx, Werle, Trautschold, Reichenbach-Klinke (34)). Die Arbeiten von Werle und Hochstraßer haben uns nun erstmals eine größere Zahl einheitlicher, chemisch reiner Hemmstoffe aus Pflanzen in die Hand gegeben, deren Wirkung auf das Gerinnungssystem wir anhand des modifizierten Nativblutgerinnungstests nach Lee-White untersuchten.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die Untersuchungen mit Inhibitormengen durchgeführt, die jeweils gegen Trypsin gleich wirksam waren. Dadurch entfällt die Berücksichtigung der bei den einzelnen Inhibitoren unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten.

Vorweg sei gesagt: Infolge der sehr hohen Streuungen

handelt es sich nur um orientierende Befunde!



Zu der Abb.: Schräg gestrichelt: 50 ImU, schwarz: 200 ImU, längs gestrichelt: 500 ImU.

Karierte Säulen links und rechts außen = Leerwert mit phys. NaCl. Tras. = Trasylol. W1, W2 = Weizen. SBI = Sojabohneninhibitor. WB = weiße Bohnen. AB = Ackerbohnen. FB = Feuerbohnen. R1, R2 = Roggen. PNTI = Erdnuß. K1a, 1b... = verschiedene Aufarbeitungen des Kartoffelinhibitors und verschiedene Fraktionen.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, verursachen vor allem die Inhibitoren aus Getreidesamen, Erdnüssen und Kartoffeln (besonders die neuere Aufarbeitung) eine starke Verzögerung der Gerinnungszeit. Auffällig ist hier wieder, daß die Hemmung bei 200 ImU in vielen, jedoch

nicht allen Fällen größer ist als bei der Zugabe von 500 ImU, soweit wir diese Inhibitormenge untersuchen konnten. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Befund bei der Ödemhemmung durch den Inhibitor aus weißen Bohnen, wo das Maximum der Wirkung ebenfalls nicht mit der größten Inhibitor-dosis zusammenfiel. Die Inhibitoren aus den vier untersuchten Bohnenarten besitzen offenbar nur geringe Hemmwirkung. Sie bewirken Gerinnungsverzögerungen, die nur gering über den physiologischen Werten in der Größenordnung der Wirkung vergleichbarer Trasylolmengen liegen. Es liegt nahe, entsprechend den auf genauen Untersuchungen von Marx und Werle (34) beruhenden Befunden beim Trasylol, die Hemmwirkung der untersuchten Inhibitoren in der Hemmung von Faktoren der Vorphase zu suchen. Die starke Gerinnungshemmung durch die Kartoffel- und Erdnußinhibitoren läßt sich durch die spezifische Hemmung des Hagemannfaktors erklären; der Angriffspunkt der Inhibitoren aus Getreidesamen ist vorerst unbekannt.

IV) Untersuchung der renalen Ausscheidung zweier pflanzlicher Inhibitoren.

Wir untersuchten die renale Ausscheidung von zwei pflanzlichen Inhibitoren, aus Feuerbohnen und Roggen, nach i.v.-Applikation an Ratten. Zu diesem Zweck injizier-

ten wir circa zweihundert Gramm schweren, jungfräulichen Ratten generell a) achtzehn Tieren 2000 ImU Roggen und b) neunzehn Tieren 2000 ImU Feuerbohnen. Beide Inhibitoren waren in einer Phosphatpufferlösung gelöst. Anschließend wurden die Tiere in Stoffwechselkäfige gesetzt. In den folgenden vierundzwanzig Stunden verblieben die Tiere in diesen Käfigen. Sie erhielten in dieser Zeit Wasser ad libitum, jedoch nichts zu fressen, da der Urin sonst zu stark verschmutzt worden wäre. Vorversuche hatten ergeben, daß die Inhibitorausscheidung nach vierundzwanzig Stunden praktisch beendet ist. Nach Ablauf der Zeit wurden die Tiere wieder aus den Käfigen befreit. Die Schrägflächen der Käfige wurden mit circa dreißig Milliliter aqua destillata im Strahl gespült, um am Käfig haftende Urinreste auch noch in das Sammelgefäß zu bekommen. Durch diese Verdünnung wird die Urineigenhemmung so gering, daß sie vernachlässigt werden kann.

Es ergab sich eine Ausscheidung in vierundzwanzig Stunden von $8 \pm 4,9 \%$ beim Roggen und $32 \pm 12 \%$ bei den Feuerbohnen.

Wir führen diese Unterschiede darauf zurück, daß die negative Ladung des Feuerbohneninhibitors die Ausscheidung über die Niere erleichtert (analog den Ergebnissen von Kemkes und Meckel beim Trasylol (31)). Über das Schicksal des nicht ausgeschiedenen Inhibitoranteils wissen wir nichts. Jedenfalls konnte auch nach mehrfacher

Injektion bei Ratten keine anaphylaktische Reaktion ausgelöst werden.

C) Experimenteller Teil

I) Pfotenödemversuch, Methodik und Material



Das Formalinödem der Rattenpfote wurde nach der von L.Grosskinsky und E.Stürmer (35) angegebenen Methode direkt volumetrisch gemessen.

Meßgerät: Ein Zentrifugenglas (lichte Weite ca. 2 cm, Höhe 6 - 8 cm) ist mit einer spitz auslaufenden Glasnase (Länge 3 - 4 cm) versehen, die von einer ca. 5 mm tiefen Kerbe im oberen Rand des Zentrifugengläschens ausgeht. Dieses Überlaufgefäß ist mit einer Markierung für die Eintauchtiefe der Rattenpfote versehen. Die verdrängte Flüssigkeit wird in einem Zentrifugenglas oder Trichter aufgefangen, der unter der Glasnase des Überlaufgefäßes angebracht ist. An den Auslauf dieses Sammelgefäßes ist ein Glasschliffzylinder,

an diesen wieder eine Kapillare (Länge ca. 90 cm, lichte Weite 2 - 2,4 mm) angeschmolzen. Der Glasschliffzylinder kann durch einen lose aufgesetzten, am unteren Ende entsprechend geschliffenen Glasstab (Länge ca. 15 cm) verschlossen werden. Die Kapillare ist mit einer Millimetereinteilung versehen. An ihrem freien Ende ist sie über ein Stück Silikonschlauch mit einem Glashahn verbunden, um ein Abbrechen der Kapillare beim Hantieren an diesem Hahn zu vermeiden.

Vorbereiten der Versuchstiere:

Die Hinterpfoten der Ratten werden mit einer Rasierklinge so rasiert, daß ca. acht Millimeter oberhalb des Talocruralgelenks ein nach proximal begrenztes Haarbüschel stehen bleibt, das in trockenem Zustand noch mit einer wasserfesten Farbe herausgehoben wird. Eine solche Markierung ist auch noch nach zwanzig Stunden Versuchsdauer gut zu erkennen.

Meßvorgang: Vor Versuchsbeginn wird das ganze System mit der Meßflüssigkeit (isotone Na-Phosphatlösung, 1 : 5 mit aqua destillata verdünnt, mit beliebigem Farbstoff angefärbt) durchgespült, um das System gleichmäßig zu befeuchten. Aus einem hoch gelegenen Vorratsgefäß wird das Überlaufgefäß so gefüllt, daß sich der Flüssigkeitsspiegel durch Abtropfen einstellen kann. Nach etwa zwei Minuten werden mit einem Tuchzipfel noch anhängende Tropfen von der Glasnase abgetupft. Anschließend wird der

Glasstab in den Schliffzylinder eingesetzt und der Glashahn am Ende der Kapillare verschlossen. Damit ist das System meßbereit.

Die Ratte, deren Pfotenvolumen bestimmt werden soll, wird in eine leichte Äthernarkose versetzt. Das Tier mit einer Hand am Rückenfell haltend, taucht man mit der anderen Hand die Pfote zuerst in einen vorgeschalteten Becher mit Meßflüssigkeit und befeuchtet die Pfote. Die Pfote wird am Becherrand leicht abgestreift und dann in das Überlaufgefäß so eingetaucht, daß Pfotenmarkierung und Gefäßmarkierung genau übereinstimmen. Nach circa zehn Sekunden wird die Pfote wieder herausgehoben, dabei etwas am Glasrand abgestreift und in das nächste Überlaufgefäß eingetaucht. Die verdrängte Flüssigkeit läuft über die Glasnase in das Auffanggefäß. Der Glasstab wird möglichst so entfernt, daß keine Blasen entstehen. Die Öffnung des Glashahns am unteren Ende der Kapillare wird mit dem Finger verschlossen und der Glashahn geöffnet. Nur durch den Druck des Fingers gesteuert, läßt man die Flüssigkeit langsam als blasenfreien Faden in die Kapillare einlaufen. Das untere Ende des Flüssigkeitsfadens stellt man möglichst auf Null ein, schließt den Hahn und liest die Länge des Fadens nach etwa zwei Minuten in Millimeter ab. Die Umrechnung von Millimeter in Milliliter erfolgt später anhand einer graphischen Darstellung, in der für diese Kapillare eine Gerade eingezeichnet ist,

die das Verhältnis Länge des Fadens in Millimeter zu Millilitern definiert.

Nach erfolgter Messung öffnet man den Glashahn und bereitet das Gerät zur nächsten Messung vor.

Die oben beschriebene Meßvorrichtung wurde sechsfach nebeneinander angeordnet, sodaß bei möglichst kurzer Narkosedauer an einem Tier sechs Messungen ganz kurz hintereinander vorgenommen werden konnten.

Da sich die Meßkapillaren in ihrer lichten Weite unterscheiden, werden sie folgendermaßen geeicht: Man pipettiert ein definiertes Volumen in alle sechs Auffangtrichter, läßt die Flüssigkeit in die Kapillaren einlaufen und mißt die Länge des Flüssigkeitsfadens in Millimeter. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis man einen guten Mittelwert erhält.

Auch die Markierung am Überlaufgefäß für die Eintauchtiefe muß geeicht werden: Am ersten Überlaufgefäß wird die Markierung willkürlich zwischen Glasoberrand und unterstem Punkt der Kerbe angebracht, von der die Glasnase ausgeht. Ein circa fünf Millimeter dicker Glasstab, mit fester Markierung und oberhalb davon einer Gummimanschette (Durchmesser etwa 2,5 cm) versehen, wird auf dieses Überlaufgefäß aufgesetzt. Die Gummimanschette ruht auf dem Rand des Überlaufgefäßes und trägt den Glasstab. Der Glasstab wird nun gegen die Manschette so verschoben, daß seine Markierung mit der am Überlauf-

gefäß angebrachten genau in einer horizontalen Ebene liegt. Das durch den Glasstab verdrängte Volumen wird mehrfach bestimmt. Anschließend wird der Glasstab auf das nächste Gefäß aufgesetzt und so lange seine Eintauchtiefe verändert, bis das verdrängte Volumen so groß wie beim ersten Gefäß ist. Nun braucht man nur noch die Markierung am Überlaufgefäß auf gleicher Höhe zur Markierung am Glasstab anzubringen.

Versuchstiere: Wir verwendeten männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von zweihundertfünfzig bis dreihundertfünfzig Gramm. Die Tiere wurden in Einzelkäfige gesetzt und erhielten während der Messung (für sechs bis sieben Stunden) nichts zu fressen oder zu trinken. Über Nacht bekamen sie das übliche standardisierte Rattenfutter (Altromin R 15) und Wasser ad libitum.

Das Pfotenödem wurde durch 3,5 mg Formaldehyd in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung ausgelöst. Diese Reizlösung wurde mit einer Kanüle Nr. 20 zwischen der zweiten und dritten Zehe tief subaponeural injiziert. Die Pfotenschwellung wurde nach 1,2,3,4,5,6 und 20 Stunden je sechs mal gemessen. Die Tiere erhielten unmittelbar vor Auslösung des Ödems die Inhibitorlösung in eine Schwanzvene injiziert. Die Inhibitoren waren in einer isotonen Phosphatpufferlösung gelöst.

II) Methodik des Nativblutgerinnungstests

(modifiziert nach Lee-White)

Ansatz: 0,5 ml Inhibitorlösung (Lösungsmittel : physiologische Kochsalzlösung) werden mit 1,5 ml Blut in silikonisierten Reagenzgläsern gemischt. Der Ansatz kommt in ein Wasserbad von 37°C. Die Zeit vom Moment der Vermischung Blut-Inhibitor bis zur Gerinnung des Blutes wird gemessen. Blutentnahme: Wir punktierten eine Armvene des Blutspenders mit einer sterilen Straußkanüle (lichte Weite 1,5 mm) und ließen jeweils angenähert 1,5 ml in die silikonisierten Reagenzgläser laufen, die bereits die Inhibitorlösung enthielten. Nach kurzem Schütteln kam das Reagenzglas in ein Wasserbad.

Durch Kippen der Reagenzgläser in Abständen von etwa einer halben Minute stellt man den Zeitpunkt der Gerinnung fest. Das Blut ist geronnen, wenn sich der Meniskus beim Kippen des Reagenzglases nicht mehr verändert.

Ergab eine Doppelbestimmung gute Übereinstimmung, so ließen wir es dabei bewenden. (Die zur Verfügung stehenden Inhibitormengen waren begrenzt.) Wichen die Werte stark ab, was bei einigen Inhibitoren der Fall war, so stellten wir mehrere Tests an. Ergaben sich auch dann noch keine eindeutigen Tendenzen, so berechneten wir den Mittelwert.

D) Literaturverzeichnis

- 1) Rocha e Silva, M. und S.R. Rosenthal : J. Pharmacol. exp. Ther. 132, 110 (1961)
- 2) Frey, E.K.: Therapiewoche 4, 323 (1953/54)
- 3) Fritz, H., Schult, H., Neudecker, M., und E. Werle: Angew. Chemie 78, 775 (1966)
und Fritz, H., Hüller, I., Wiedemann, M., und E. Werle: Z. physiol. Chem. 348, 405 (1967)
- 4) Hochstraßer, K., Muss, M., und E. Werle: Z. physiol. Chem. 348, 1337 (1967)
- 5) Ozawa, K., und M. Laskowski jr.: J. biol. Chem. 241, 3955 (1966)
- 6) Fritz, H., Fink, E., Gebhardt, M., Hochstraßer, K., und E. Werle: Z. physiol. Chem. 350, 933 (1969)
- 7) Waldvogel, G., und M. Frimmer: Arch. exp. Path. Pharmacol. 258, 321 (1967)
- 8) Lewis, G.P.: Ann. N.Y. Acad. Sc. 104, 236 (1963)
- 9) Berndt, G., Frimmer, M., und H. Rhode: Med. Pharmacol. 245, 230 (1963)
- 10) Habermann, E.: Arch. exper. Path. Pharmacol. 245, 230 (1963)
- 11) Menkin, V.: Int. Arch. Allergy 4, 131 (1953)
- 12) Hladovec, J., und M. Rybak: Biochem. Pharmacol. 12, 1058 (1963)
- 13) Kalbhen, D.A.: Arch. int. Pharmacodyn. 143, 337 (1963)
- 14) Mörsdorf, K., und G. Cornelissen: Med. Pharmacol. exp. 15, 399 (1966)
- 15) Förster, O., Kaiser, E., und E. Stoklaska: Z. f. Imm.-forsch., Allergie und klin. Immunologie 136, 158 (1968)
- 16) Kaller, H. in "Neue Aspekte der Trasylol-Therapie", 1, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1965
- 17) Mansfeld, V., Rybak, M., Horakova, Z., und J. Hladovec: Z. Physiol. Chem. 381, 6 (1960)

- 18) Wilhelm,D.L., Miles,A.A., und M.E.Mackay: Brit.J.exp.
Path. 36,82 (1955)
- 19) Webster,M.E., und J.Innerfield: Enzymol.biol.clin.
5,129 (1965)
- 20) Webster,M.E.: Arthritis Rheumatism 9,473 (1966)
- 21) Eisen,V.: Brit.med.Bull. 20,205 (1964)
- 22) Frey,E.K., Kraut,H., und E.Werle: "Das Kallikrein-
Kinin-System und seine Inhibitoren", Seite 220ff,
F.Enke-Verlag, Stuttgart, 1968
- 23) Hochstraßer,K.: Habilitation, Univ.München, 1969
- 24) Formanek,K., Höller,H.J.A., und E.Stoklaska: Arch.
exp.Path.Pharmakol. 242,228 (1961)
- 25) Marx,R.; in "Neue Aspekte der Trasylol-Therapie", 2,
89ff, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1967
- 26) Vogel,R., Trautschold,I., und E.Werle: "Natürliche
Proteinasen-Inhibitoren", Thieme-Verlag, Stuttgart,
1966
- 27) Förster,O., und E.Stoklaska: Med.Pharmakol.exp.
17,77 (1967)
- 28) Hochstraßer,K., und E.Werle: Z.physiol.Chem. 350,
897 (1969)
- 29) Hochstraßer,K., Illchmann,K., und E.Werle: Z.physiol.
Chem. 350,929 (1969)
- 30) Haberland,G.L.: Arch.exp.Path.Pharmakol. 241,160 (1961)
- 31) Meckel,D., Kemkes,B., Reichenbach-Klinke,K.E., Hoch-
straßer,K., Fritz,H., und E.Werle: Z.Arzneimittel-
forschg. 19,1025 (1969)
- 32) Lorenz,W.: Habilitation, Univ. München, 1969
- 33) Edery,H., und G.P.Lewis: J.Physiol. 163,48P (1962)
169,568 (1963)
- 34) Werle,E., Marx,R., und K.E.Reichenbach-Klinke: Blut
14,206 (1967)
- 35) Grosskinsky,L., und E.Stürmer: Ztschr.f.d.ges.exp.
Med. 118,415 (1952)

E) Anhang: Statistisch ausgewertete Ergebnisse des Pfo-
tenödemversuchs in Zahlen

Alle Rechnungen wurden am Olivetti-Tischcomputer aus-
geführt. Wir bearbeiteten das aus den Pfo-tenödemversuchen
gewonnene Zahlenmaterial mit dem Student-t-Test.

Verwendete Symbole:

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = geschätzte Standardabweichung der Grundgesamt-
heit

n = Umfang der Stichprobe

t = Testgröße für die Differenz zweier Stichproben-
mittelwerte

p = Signifikanz

Verwendete Formeln:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\bar{x}_1 = \frac{1}{n_1} \cdot \sum_{i=1}^{n_1} x_1^{(i)}$$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Inhibitor aus Rinderorganen: Trasylol^R

5600 ImU:

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,428	0,103	8		
2	0,514	0,159	8		
3	0,589	0,189	8		
4	0,594	0,209	8	0,784	0,25-0,20
5	0,568	0,259	8	1,335	0,15-0,10
6	0,640	0,296	8	1,054	0,20-0,15
20	0,940	0,262	8		

16 800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,433	0,130	6	0,322	0,40-0,35
2	0,513	0,087	6	0,356	0,40-0,35
3	0,475	0,084	6	1,524	0,10-0,05
4	0,490	0,081	6	2,186	0,05-0,025
5	0,480	0,098	6	2,469	0,025-0,0125
6	0,487	0,143	6	3,051	0,0125-0,01
20	0,807	0,284	6	1,273	0,15-0,10

Inhibitor aus Rinderorganen: Trasylol^R

16 800 ImU 2 Stunden vor Ödemauslösung

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,480	0,091	6	-0,528	0,35-0,30
2	0,573	0,154	6	-0,651	0,30-0,25
3	0,650	0,146	6	-0,800	0,25-0,20
4	0,692	0,160	6	-0,507	0,35-0,30
5	0,733	0,180	6	-0,634	0,30-0,25
6	0,772	0,175	6	-0,458	0,35-0,30
20	0,890	0,165	6	0,545	0,35-0,30

16 800 ImU 24 Stunden vor Ödemauslösung

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,478	0,076	6	-0,505	0,35-0,30
2	0,518	0,099	6	0,264	0,40
3	0,605	0,105	6	-0,225	0,45-0,40
4	0,692	0,145	6	-0,514	0,35-0,30
5	0,777	0,160	6	-1,160	0,15
6	0,813	0,155	6	-0,977	0,20-0,15
20	0,878	0,210	6	0,643	0,30-0,25

Tierische Inhibitoren

Bdellin, 16 800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,397	0,086	6	1,025	0,20-0,15
2	0,523	0,141	6		
3	0,578	0,114	6		
4	0,643	0,109	6		
5	0,647	0,092	6	0,405	0,35
6	0,678	0,105	6	0,701	0,25
20	0,927	0,153	6	0,166	0,45-0,40

Hundesubmandibularisinhibitor, 16 800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,340	0,091	6	2,071	0,05-0,025
2	0,432	0,090	6	1,794	0,10-0,05
3	0,547	0,149	6	0,534	0,30
4	0,590	0,183	6	0,774	0,25-0,20
5	0,632	0,203	6	0,546	0,30
6	0,687	0,237	6	0,525	0,30
20	1,012	0,219	6	-0,689	0,30-0,25

Inhibitor aus weißen Bohnen

1400 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,515	0,181	6	-1,038	0,20-0,15
2	0,608	0,199	6	-1,142	0,15
3	0,605	0,189	6		
4	0,672	0,158	6		
5	0,715	0,152	6	-0,429	0,35
6	0,792	0,193	6	-0,685	0,30-0,25
20	0,923	0,191	6		

2800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,424	0,075	5	0,477	0,35-0,30
2	0,454	0,060	5	1,314	0,15-0,10
3	0,492	0,065	5	1,194	0,15
4	0,512	0,090	5	1,723	0,10-0,05
5	0,534	0,128	5	1,626	0,10-0,05
6	0,538	0,119	5	2,264	0,05-0,025
20	0,926	0,360	5		

Inhibitor aus weißen Bohnen

5600 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,434	0,168	10	0,345	0,40-0,35
2	0,453	0,193	10	1,442	0,10-0,05
3	0,511	0,187	10	1,159	0,15-0,10
4	0,559	0,208	10	1,351	0,10
5	0,574	0,232	10	1,399	0,10
6	0,631	0,249	10	1,323	0,10
20	0,884	0,294	10	0,635	0,30-0,25

16800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,430	0,116	9		
2	0,534	0,122	9		
3	0,577	0,172	9		
4	0,649	0,145	9		
5	0,738	0,144	9	-0,841	0,25-0,20
6	0,741	0,142	9		
20	1,037	0,212	9	-1,099	0,15

Inhibitor aus Feuerbohnen

2800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,398	0,068	6	1,010	0,20-0,15
2	0,465	0,069	6	1,228	0,15-0,10
3	0,580	0,066	6		
4	0,645	0,090	6		
5	0,712	0,116	6	-0,398	0,40-0,35
6	0,758	0,138	6	-0,308	0,40-0,35
20	0,743	0,092	6	2,150	0,05-0,025

5600 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,398	0,068	6	1,010	0,20-0,15
2	0,465	0,069	6	1,228	0,15-0,10
3	0,580	0,066	6		
4	0,645	0,090	6		
5	0,712	0,116	6	-0,398	0,40-0,35
6	0,758	0,138	6	-0,308	0,40-0,35
20	0,743	0,092	6	2,150	0,05-0,025

Inhibitor aus Feuerbohnen

16 800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,403	0,037	6	0,934	0,20
2	0,467	0,049	6	1,215	0,15-0,10
3	0,552	0,073	6	0,493	0,35-0,30
4	0,642	0,093	6	0,137	0,45
5	0,675	0,070	6		
6	0,732	0,073	6		
20	0,773	0,059	6	1,848	0,10-0,05

Kartoffel 1a, 2800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,384	0,053	7	1,391	0,15-0,10
2	0,456	0,109	7	1,436	0,10
3	0,557	0,114	6	0,416	0,35
4	0,607	0,142	6	0,586	0,30
5	0,648	0,125	6	0,377	0,40-0,35
6	0,707	0,108	6	0,340	0,40-0,35
20	1,020	0,144	6	-0,813	0,25-0,20

Kartoffel 3

2800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,297	0,084	6	2,897	0,0125
2	0,368	0,104	6	2,868	0,0125
3	0,448	0,098	6	1,869	0,05
4	0,520	0,123	6	1,734	0,10-0,05
5	0,552	0,181	6	1,493	0,10
6	0,588	0,126	6	1,818	0,05
20	0,858	0,121	6	0,897	0,20

Erdnüsse, PNTI IIa

2800 ImU

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,343	0,064	6	2,061	0,05-0,025
2	0,393	0,077	6	2,499	0,025
3	0,440	0,070	6	2,008	0,05
4	0,453	0,082	6	2,679	0,025-0,0125
5	0,487	0,076	6	2,411	0,025
6	0,503	0,211	6	1,160	0,15

Na-Thioglykolat

10 mg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,370	0,085	6	1,524	0,10
2	0,470	0,120	6	1,083	0,15
3	0,562	0,122	6	0,348	0,40-0,35
4	0,650	0,098	6		
5	0,712	0,138	6	-0,393	0,40-0,35
6	0,754	0,133	5	-0,236	0,45-0,40
20	0,994	0,147	5	-0,496	0,35-0,30

30 mg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,338	0,062	6	2,160	0,05-0,025
2	0,398	0,073	6	2,418	0,025
3	0,455	0,079	6	1,798	0,10-0,05
4	0,483	0,122	6	2,218	0,05-0,025
5	0,485	0,148	6	2,334	0,025
6	0,532	0,128	6	2,523	0,025
20	0,730	0,097	6	2,289	0,05-0,025

Na-Thioglykolat

60 mg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,385	0,074	6	1,256	0,15
2	0,418	0,108	6	1,991	0,05
3	0,485	0,128	6	1,351	0,10
4	0,470	0,134	6	2,373	0,025
5	0,485	0,142	6	2,343	0,05-0,025
6	0,515	0,160	6	2,658	0,025-0,0125
20	0,787	0,151	6	1,630	0,10-0,05

150 mg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,352	0,029	6	1,942	0,05
2	0,438	0,056	6	1,723	0,10-0,05
3	0,470	0,043	6	1,617	0,10-0,05
4	0,455	0,081	6	2,658	0,025-0,0125
5	0,508	0,073	6	2,143	0,05-0,025
6	0,532	0,046	6	2,641	0,025-0,0125
20	0,680	0,057	2	1,656	0,15-0,10

Na-Thioglykolat

300 mg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,282	0,083	6	3,180	0,01
2	0,288	0,093	6	4,306	0,0025
3	0,298	0,079	6	3,915	0,005
4	0,297	0,076	6	4,806	0,0025
5	0,350	0,095	6	4,087	0,005-0,0025

Kininasehemmer

Cystein, 300mg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,397	0,116	6	0,989	0,20
2	0,468	0,136	6	1,089	0,15
3	0,575	0,150	6	0,168	0,45-0,40
4	0,665	0,176	6	-0,164	0,45-0,40
5	0,708	0,200	6	-0,335	0,40-0,35

Kininasehemmer

p-CMB, 5 ml einer gesättigten wässrigen Lösung

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,342	0,049	6	2,115	0,05-0,025
2	0,408	0,063	6	2,255	0,05-0,025
3	0,538	0,058	6	0,678	0,25
4	0,605	0,043	6	0,643	0,30-0,25
5	0,650	0,060	6	0,368	0,40-0,35

Antihistaminika

Antistin, 200 mcg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,296	0,037	7	3,258	0,01-0,005
2	0,363	0,051	7	3,341	0,01-0,005
3	0,436	0,072	7	2,225	0,025
4	0,457	0,097	7	2,802	0,0125
5	0,480	0,088	7	2,673	0,025-0,0125
6	0,509	0,076	7	3,133	0,01-0,005
20	0,726	0,136	7	2,455	0,025

Antihistaminika

Tavegil, 310 mcg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,375	0,058	6	1,464	0,10
2	0,467	0,076	6	1,192	0,15
3	0,527	0,062	6	0,836	0,25-0,20
4	0,563	0,085	6	1,193	0,15
5	0,625	0,115	6	0,666	0,30-0,25
6	0,665	0,121	6	0,861	0,25-0,20
20	0,858	0,092	6	0,909	0,20

Kolton, 340 mcg

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,337	0,084	7	2,295	0,025
2	0,450	0,062	7	1,621	0,10-0,05
3	0,477	0,091	7	1,602	0,10-0,05
4	0,583	0,114	7	0,981	0,20-0,15
5	0,620	0,112	7	0,783	0,25
6	0,687	0,136	7	0,616	0,30-0,25
20	0,884	0,123	7	0,666	0,30-0,25

Kombination

16 800 ImU Trasylol + 200 mcg Antistin

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,320	0,072	11	3,282	0,005-0,0025
2	0,362	0,087	11	3,971	0,0025-0,0005
3	0,420	0,120	11	2,893	0,01-0,005
4	0,475	0,139	11	2,974	0,01-0,005
5	0,512	0,160	11	2,558	0,0125
6	0,576	0,137	11	2,519	0,0125
20	0,852	0,095	11	1,301	0,10

Kontrollgruppe

Messung (nach Stunde)	$\bar{x}$	s	n	t	p
1	0,452	0,124	26		
2	0,533	0,131	26		
3	0,588	0,176	26		
4	0,652	0,176	26		
5	0,679	0,190	26		
6	0,733	0,183	23		
20	0,943	0,220	23		

Lebenslauf

Am 5. Oktober 1942 wurde ich als fünftes von sieben Kindern der Eheleute Dr. med. habil. Harald Taeger, Facharzt für innere Krankheiten, und Margarete Taeger, geborene Westermayer, in München geboren. 1948 wurde ich in der evangelischen Volksschule Fürstenfeldbruck eingeschult, von der ich nach vier Jahren an den humanistischen Zweig der Oberrealschule Fürstenfeldbruck übertrat. Nach Abschluß der sechsten Klasse besuchte ich das Karls-Gymnasium in München-Pasing, wo ich meine Schulzeit am 18. Juli 1962 mit der Reifeprüfung beendete. Von 1962 bis 1964 leistete ich meinen Wehrdienst ab; ich wurde als Leutnant (San) der Reserve entlassen. Seit Oktober 1964 studiere ich an der Universität München Medizin. Vorphysikum und Physikum bestand ich jeweils mit der Gesamtnote "gut". Ich habe die Absicht, mich im Frühjahr 1970 dem medizinischen Staatsexamen zu unterziehen.

Harald Taeger

